

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

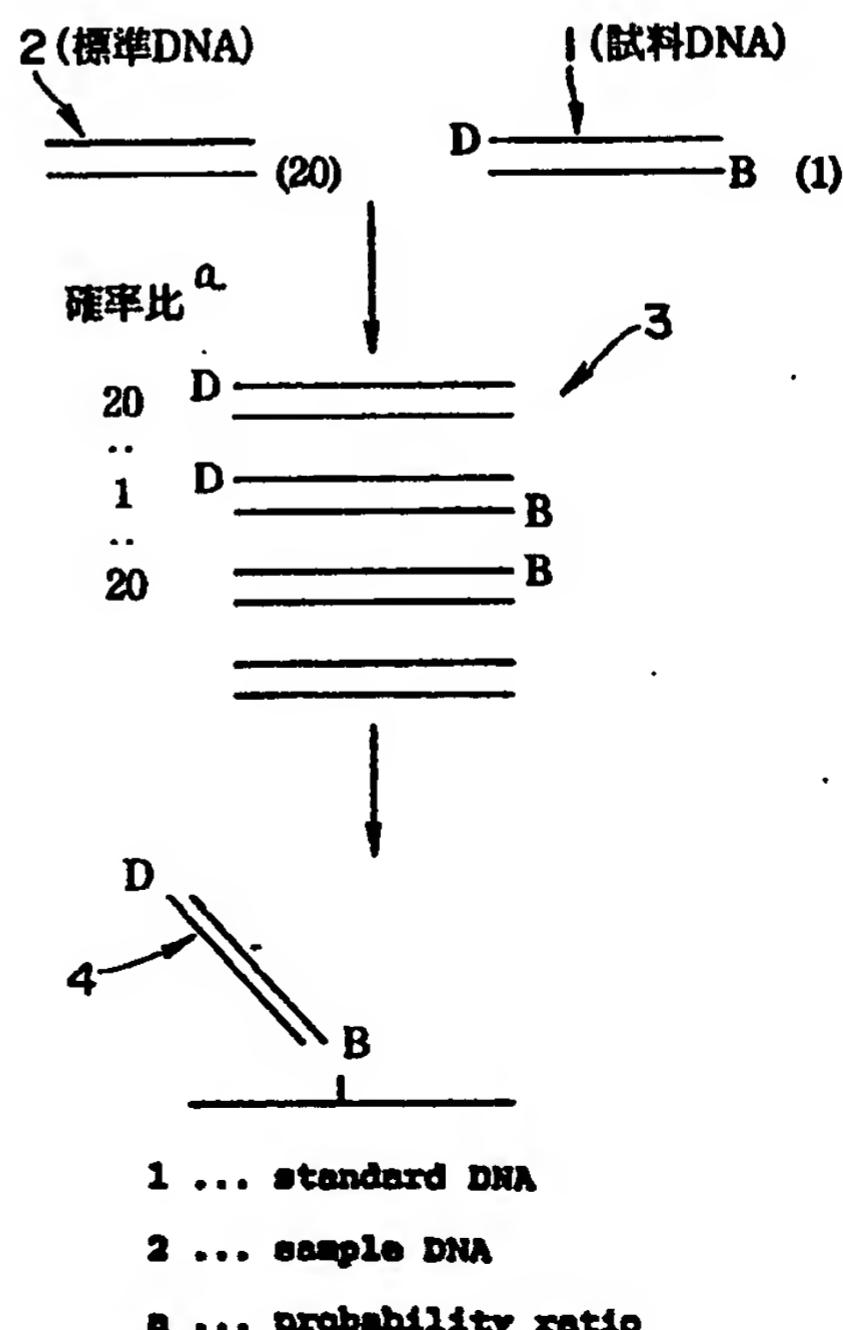
(51) 国際特許分類 6 C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/02068
		(43) 国際公開日 1995年1月19日 (19.01.95)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 POT/JP94/01106 1994年7月7日 (07. 07. 94)		添付公開書類 国際調査報告書
(30) 優先権データ 特願平5/194196 1993年7月9日 (09. 07. 93) JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 湧水製薬株式会社 (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) (JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区伏見町4丁目2番14号 Osaka, (JP)		
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 岡 孝紀 (OKA, Takanori) (JP/JP) 松永裕也 (MATSUNAGA, Hironari) (JP/JP) 山根明男 (YAMANE, Akio) (JP/JP) 〒739-11 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧水製薬株式会社内 Hiroshima, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 小島隆司 (KOJIMA, Takashi) 〒104 東京都中央区銀座2丁目13番19号 銀座森澤ビル3階 Tokyo, (JP)		
(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		

(54) Title METHOD OF DISCRIMINATING NUCLEIC ACID AND TESTING SET FOR DISCRIMINATING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称 核酸の識別方法及び核酸の識別用検査セット

(57) Abstract

A method of discriminating nucleic acids by examining the presence or absence of variant genes in a nucleic acid, the ratio of normal genes to variant genes, or the identity among specified genes present in various samples, which method comprises amplifying a specified region of a target nucleic acid present in a specimen by the polymerase chain reaction using a primer bearing a detectable marker and a primer bearing a site capable of binding to a solid-phase carrier, conducting competitive hybridization by adding the resultant nucleic acid as a marker sample DNA in at least an equimolar amount to a non-marker standard DNA of which the identity with the sample DNA is to be discriminated, and then measuring the marker intensity of the product of hybridization. A testing set for discriminating nucleic acids according to the above method comprises a primer to be used for amplifying a target nucleic acid and comprising a primer bearing a detectable marker and a primer bearing a site capable of binding to a solid-phase carrier, and a non-marker standard DNA of which the identity with a gene amplified by the amplifying primer is to be discriminated.



(57) 要約

検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとを用い、PCR法にて検体中の目的核酸の特定領域の増幅を行ない、これを標識試料DNAとして該試料DNAとの同一性を識別したい非標識標準DNAに等モル以上加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行ない、反応終了後、ハイブリダイゼーション生成物の標識強度を測定することにより、核酸中の変異遺伝子の有無、正常遺伝子と変異遺伝子との比、あるいは複数の試料中の特定遺伝子の同一性を調べる核酸の識別方法を提供する。

また、この識別方法により核酸を識別する為の核酸の識別用検査セットとして、検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用プライマーと、該プライマーにより増幅された遺伝子増幅物との同一性を識別したい非標識DNA標品とを具備する核酸の識別用検査セットを提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM アルメニア	DK デンマーク	LI リヒテンシュタイン	PT ポルトガル
AT オーストリア	EE エストニア	LK スリランカ	RO ルーマニア
AU オーストラリア	ES スペイン	LT リトアニア	RU ロシア連邦
BB バルバドス	FI フィンランド	LR リベリア	SD スーダン
BE ベルギー	FR フランス	LU ルクセンブルグ	SE スウェーデン
BF ブルキナ・ファソ	GA ガボン	LV ラトヴィア	SI スロヴェニア
BG ブルガリア	GB イギリス	MC モナコ	SK スロヴァキア共和国
BJ ベナン	GE グルジア	MD モルドバ	SN セネガル
BR ブラジル	GN ギニア	MG マダガスカル	SZ スワジランド
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	ML マリ	TD チャード
CA カナダ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TG トーゴ
CF 中央アフリカ共和国	IE アイルランド	MR モーリタニア	TJ タジキスタン
CG コンゴー	IT イタリー	MW マラウイ	TT トリニダードトバゴ
CH スイス	JP 日本	MX メキシコ	UA ウクライナ
CI コート・ジボアール	KE ケニア	NE ニジェール	US 米国
CM カメルーン	KG キルギスタン	NL オランダ	UZ ウズベキスタン共和国
CN 中国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NO ノルウェー	VN ヴィエトナム
CZ チェコ共和国	KR 大韓民国	NZ ニュージーランド	
DE ドイツ	KZ カザフスタン	PL ポーランド	

明細書

核酸の識別方法及び核酸の識別用検査セット

技術分野

5 本発明は、核酸の識別方法及び核酸の識別用検査セットに関し、更に詳述すると、核酸中の変異遺伝子の有無並びに正常遺伝子と変異遺伝子との比を検体から直接、短時間で検出することができ、従来検出が困難とされていた、遺伝子内の不特定位置に存在する変異の検出や正常細胞中に混在する変異遺伝子を持った少量の異常細胞の検出あるいは複数の試料中の特定遺伝子の同一性を調べることが可能な核酸の識別方法及び該方法により核酸の識別を行なうための核酸の識別用検査セットに関する。

背景技術

15 近年、分子生物学、遺伝学の発展は著しく、これらの蓄積された成果は生命現象の化学的／物理的解明に寄与するのみならず、人間に対して、特に医学や医療に対しても大きな影響を与え、DNAから出発するDNA医学が予想を遙かにこえて、臨床分野にまで大きく進みつつある。最近では、殆ど全ての疾患がDNAに関係しているということがわかってきており、遺伝子レベルでの診断は必要不可欠なものとなりつつある。

20 今日、遺伝子疾患（分子病）と総称される疾患には、先天性代謝異常症として古くから知られていた数多くの酵素欠損症が殆ど全て該当するということが分かっており、こ

これら遺伝子疾患の診断には、遺伝子上の変異を検出するこ
とが極めて有効である。

従来、遺伝子上の変異を検出する方法としては、遺伝子
変異の位置が分かっている場合には、オリゴヌクレオチド
5 プローブを用いる検出方法 (PNAS, 80, 278 (1983)) や
制限酵素多型性を利用する方法 (Am.J.Hum.Genet., 69
201 (1980))、リボヌクレアーゼを利用して RNA : DNA
ハイブリッド中の一塩基ミスマッチを切断する方法 (Science
230, 1243 (1985)) 等がある。

10 また、遺伝子增幅法を利用する変異の検出法も開発され
ている (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88, 189 (1991),
Anal.Biochem. 186, 64 - 68 (1990))。しかしながら、
これらの方法は、塩基配列が既知で、しかも特定の変異の
検出に限られている。一方、ある領域内の不特定な変異 (位
15 置、塩基) を検出する方法としては、SSCP法 (Proc.Natl.
Acad.Sci.USA 86, 2766 (1989))、DGGE法 (Proc.
Natl.Acad.Sci.USA 86, 232 (1989)) 等が報告され
ているが、これらの方法は電気泳動法を利用しており、操
作性や迅速性を考えると必ずしも実用的でない。

20 そこで、ニコラス (J.C.Nicolas) らは核酸のある領域
内の不特定の変異を検出する系として以下のようない方法を
開発した (ヨーロッパ公開 362042 号、Anal.Biochem.
205, 193 (1992))。まず、変異を検出しようとする領域
を含む核酸断片の二本鎖の一方にビオチン標識を導入し、他
25 方に FITC 標識を導入して標識標準 DNA とし、これに標準

DNAと同じ領域の非標識の核酸断片を含む試料DNAを過剰量添加混合して加熱変性させた後、徐々に温度を下げる(コンペティティブハイブリダイゼーション)。これにより、試料中に標識標準DNAと全く同じ塩基配列を含む断片が存在する場合には、標識標準DNAの二本鎖と試料DNA中の二本鎖との間に組み換えが起こり、最初に存在したビオチン標識とFITC標識の両方を持つ標識標準DNAの量が減少する。一方、試料中に標識標準DNAと一部異なる塩基配列を含む断片が存在する場合には、先のような標識標準DNAの二本鎖と試料DNA中の二本鎖の間で組み換えは起こりにくく、よって最初に存在した標識標準DNA量はほとんど変化しない。つまり、一連の混合、変性、アニーリング(コンペティティブハイブリダイゼーション)の操作の後、最初に加えた標識標準DNA量の変化を見ることで、標識標準DNAと同じ塩基配列を含む断片が存在するか否かを判定する方法である。

ここで、一般に先天的な遺伝性疾患の場合には、優性遺伝するものと劣性遺伝するものとがある。前者は遺伝子の異常が対立遺伝子の一方にのみ存在する場合(ヘテロ)でもその発現型を示し、後者はその異常が対立遺伝子の両方に存在する場合(ホモ)にのみ発現型を示すものである。上記劣性遺伝の場合、遺伝子の異常が対立遺伝子の一方のみに存在するときには、その遺伝子異常は疾病となって表れるわけではないが、その子孫がその遺伝子を受け継ぐ可能性は高い。従って、ホモ或いはヘテロにかかわりなく、そ

の遺伝子異常を調べることには重要な意義がある。また、ヒト白血球抗原（HLA）のタイピングにおいては、試料の対立遺伝子がホモと判定されても、従来法では本当にホモであるかどうかを正確に判断することができず、その確認方法の確立が望まれている。
5

更に、後天的な遺伝子の異常によって生じる疾患、即ちガン等の遺伝子診断を行う場合、ガン病片からガン細胞のみを集めることは非常に困難であり、常に正常細胞が混入する。このように、正常細胞と変異細胞とが混在する状況
10 下で、変異細胞中の変異遺伝子を検出することは、ガン等の後天的な遺伝子疾患の診断において、非常に意義深いことである。

しかしながら、上記ニコラスらの方法においては、正常遺伝子と変異遺伝子とが混在している場合、変異遺伝子を正確に検出することは困難である。例えば、正常な遺伝子を含む核酸断片を標識標準DNAとして使用すると、試料中の核酸の当該遺伝子の1/2が正常遺伝子（ヘテロ）である場合と、すべてが正常遺伝子である場合（正常でホモ）とで、結果として得られるシグナルに顕著な差が見られない。
15 従って、上述した遺伝子の変異による疾病的診断においてはこれらの方法では不十分である。
20

従って、遺伝病の診断等に有効かつ実用的な核酸の識別方法の開発が望まれている。

発明の開示

25 本発明は、遺伝子領域の不特定の変異の有無のみならず、

その変異が対立遺伝子の両方に起きているのか、或いは一方のみに起きているのかを検出することができ、また正常細胞中に混在するわずかな変異も検出可能であると共に、その存在比をも測定可能あり、かつ複数の検体間でその特定の対立遺伝子が完全に一致しているか否かを確認することが可能な核酸の識別方法、及び、該識別方法の実施に使用される核酸の識別用検査セットを提供することを目的とする。

本発明者らは、上記目的を達成するため、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸を用いた目的核酸検出システム（ED - PCR 法；特開平 1 - 314965 号、同 1 - 252300 号公報、J.Clin.Microbiol.30,1728 (1992) 等参照）を利用して以下の実験を行い、鋭意検討を行った。

まず、変異遺伝子を含むと考えられる試料 DNA を上記二種の標識したプライマーで遺伝子増幅反応を行って標識試料 DNA とし、一方変異のない正常遺伝子を上記プライマーと同じ塩基配列でかつ標識のないプライマーで遺伝子増幅反応を行って非標識標準 DNA とした。次に、上記標識試料 DNA に上記非標識標準 DNA を等モル以上加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、標識試料 DNA と非標識標準 DNA との組み換え率を ED - PCR 法のシステムを利用して測定した。その結果、標識試料 DNA に対して等モル以上の非標識標準 DNA を加えることによって、ある遺伝子領域の不特定の変異のみならず、その変異が対立遺

伝子の両方に起きているのか、或いは一方のみに起きているのかを検出することができ、更には変異遺伝子の存在比率が 10 % 程度でも検出することができ、しかもその存在比をも測定できることが明らかになった。また、この方法を用いると 2 つの検体 DNA 中の特定遺伝子に関して一方を標識試料 DNA 、他方を非標識標準 DNA とすることにより、これら遺伝子の同一性、即ちこれら遺伝子が互いに同一であるのか或いは完全に異なっているのか又は部分的に異なるっているのか、更にはどの程度異なるているのかを調べることが可能であることを見出し、本発明を完成するに至ったものである。

即ち、本発明者らは、従来法においては、標識した標準 DNA に非標識の試料 DNA を過剰に加え、コンペティティブハイブリダイゼーションするのに対し、これとは逆に標識した試料 DNA に非標識の標準 DNA を過剰に加えてコンペティティブハイブリダイゼーションすることにより、後述するように正常遺伝子と変異遺伝子との存在比に関係なく変異の有無を検出することができること、また試料中に存在する正常遺伝子と変異遺伝子との比と、コンペティティブハイブリダイゼーションの結果生じる固相担体に結合可能な標識物と検出可能な標識物との両方を持つ分子を定量した測定値との間に比例的相関関係が得られ、上記測定値から、それらの存在比を比較的容易に算出することができること、更には複数の検体 DNA の特定遺伝子に関して、それぞれ標識試料 DNA 、非標識標準 DNA とすることによ

り、これら遺伝子の同一性を調べることも可能であることを見出し、本発明を完成したものである。

従って、本発明は検体中の目的核酸の特定領域内の遺伝子を識別するに当たり、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用のプライマーを用いて、検体中の目的核酸の特定領域の遺伝子増幅を行ない、その結果得られた標識DNAを試料DNAとともに、この試料DNAとの同一性を識別したい非標識のDNA標品を標準DNAとし、上記試料DNAに上記標準DNAを等モル以上加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行なった後、上記検出可能な標識物と固相担体に結合可能な部位とを利用して上記試料DNAと上記標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することによって、核酸の同一性を識別することを特徴とする核酸の識別方法を提供する。

また、本発明は、上記本発明の識別方法により核酸を識別する為の核酸の識別用検査セットとして、検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用プライマーと、該プライマーにより増幅された遺伝子増幅物との同一性を識別したい非標識DNA標品とを具備してなることを特徴とする核酸の識別用検査セットを提供する。

ここで、本発明の核酸の識別用検査セットは、目的核酸内の特定領域内の核酸の増幅用プライマーと、必要に応じて細胞破壊処理等の前処理を施した検体とを混合し、これ

に核酸の増幅を行なうための試薬を添加して、検体中の目的核酸の増幅を行ない、これに上記非標識 DNA 標品を加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行なった後、得られたハイブリダイゼーション生成物を固相担体に結合可能な部位を利用して担体にトラップし、検出可能な標識を利用して測定するものであり、この場合上記核酸増幅用プライマー及び非標識 DNA 標品に、更に細胞破壊試薬、核酸増幅を行なうための試薬、ハイブリダイゼーション生成物をトラップするための担体等の ED - PCR 法に用いられるものと同様の試薬や部材を加えて、核酸の識別用検査セットとすることができます。

なお、本発明の好適な実施態様は下記の記載から明瞭となるであろう。

図面の簡単な説明

図 1 は、全てが正常な核酸について核酸の識別方法を実施した場合を示した模式図であり、(A) は本発明方法、(B) は従来方法 (ニコラスらの方法) を示す。

図 2 は、半数が変異した核酸について核酸の識別方法を実施した場合を示した模式図であり、(A) は本発明方法、(B) は従来方法 (ニコラスらの方法) を示す。

図 3 は、全てが変異した核酸について核酸の識別方法を実施した場合を示した模式図であり、(A) は本発明方法、(B) は従来方法 (ニコラスらの方法) を示す。

図 4 は、本発明の核酸の識別方法による吸光度と試料 DNA 中の変異割合との関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明に係る核酸の識別方法は、従来法では標識した標準DNAに非標識の試料DNAを過剰に加え、コンペティティブハイブリダイゼーションするのに対し、これとは逆に5 標識した試料DNAに非標識の標準DNAを過剰に加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、上記試料DNAと標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することにより、遺伝子領域の不特定の変異の有無のみならず、その変異が対立遺伝子の両方に起きているのか、或いは一方のみに起きているのかを検出すること、正常細胞10 中に混在するわずかな変異を検出すると共にその存在比をも測定し得ること、複数の検体間でその特定の対立遺伝子が完全に一致しているか否かを確認することを可能にしたものである。

即ち、本発明の核酸の識別方法とニコラスらの方法 (Anal. Biochem. 205, 193 (1992) 記載の方法) とを模式図を用いて比較しながら理論的に考察すると、以下の通りである。

図1は全てが正常な遺伝子について検出を行なった場合を20 模式的に示したもので、本発明方法は (A) 図に示したよう に、一方に検出可能な標識 (D)、他方に固相担体と結合可 能な標識 (B) を導入した2種の異なるプライマーで、検体 中の変異を検出しようとする遺伝子の増幅反応を行なって 標識試料DNA1とし、一方同じ塩基配列をもつ非標識の25 プライマーで該遺伝子の増幅反応を行って非標識標準DNA2

とする。次いで、標識試料DNA1と非標識標準DNA2とを1:20の割合で混合変性し、アニーリングすることによりコンペティティブハイブリダイゼーションを行なう。これにより、一方に検出可能な標識(D)、他方に固相担体と結合可能な標識(B)を有する核酸が1/21に希釈される(参考符号3参照)。次に、この反応生成物を固相担体にトラップして組み換えの起こっていない元のままの標識試料DNA1を測定する(参考符号4参照)。この場合、測定値は理論上当初の1/21(0.048)となる。

一方、ニコラスらの方法は図1(B)に示したように、非標識の試料DNA1' と一方に検出可能な標識(D)、他方に固相担体と結合可能な標識(B)を導入した標識標準DNA2' とを20:1で混合変性し、アニーリングすることによりコンペティティブハイブリダイゼーションを行なう(参考符号3')。次に、その反応生成物を固相担体にトラップして組み換えの起こっていない元の状態の標識標準DNA2'を測定する(参考符号4')。すると、この場合も本発明方法と同様に、コンペティティブハイブリダイゼーションにより標識(D),(B)を含む標識標準DNA2'が1/21に希釈され、測定値は理論上当初の1/21(0.048)となる。

従って、試料中遺伝子の塩基配列と標準DNAの塩基配列が全く同じであれば、本発明方法及び従来方法(ニコラス法)ともコンペティティブハイブリダイゼーション後の測定値は理論上当初の1/21(0.048)となる。

次に、試料中遺伝子の一方のみに変異を有する場合は、図

2 の模式図に示したようになる。即ち、本発明方法及び従来法（ニコラス法）とも、上記図 1 の場合と同様の操作により、試料 DNA 1,1' と標準 DNA 2,2' とを混合変性し（本発明方法 1:20、従来法 20:1）、アニーリングによりコンペティティブハイブリダイゼーションを行ない、反応生成物 3,3' を固相担体にトラップして組み換えの起こっていない元の状態の標識 DNA を測定する（参照符号 4,4'）。この場合、本発明方法ではコンペティティブハイブリダイゼーションにより標識（D）,（B）を含む合成核酸が 42/82 に希釈され（参照符号 3）、測定値は理論上当初の 42/82 (0.51) となる。一方、従来法（ニコラス法）ではコンペティティブハイブリダイゼーションにより標識（D）,（B）を含む組み換えの起こっていない元の状態の標識 DNA が 1/11 に希釈され、測定値は理論上当初の 1/11 (0.091) となる。

更に、試料中の遺伝子が変異のあるもののみの場合は、図 3 (A),(B) に示したように、本発明方法及び従来法（ニコラス法）ともに図 1,2 の場合と同様の操作により、試料 DNA 1,1' と標準 DNA 2,2' とを混合変性し（本発明方法 1:20、従来法 20:1）、アニーリングによりコンペティティブハイブリダイゼーションを行ない、反応生成物 3,3' を固相担体にトラップして組み換えの起こっていない元の状態の標識 DNA を測定する（参照符号 4,4'）。その結果は、本発明方法及び従来法（ニコラス法）ともコンペティティブハイブリダイゼーションにより標識（D）,（B）を含む標識 DNA は全く希釈されることなく、測定値は理論上元のままである。

上記変異の割合による組み換えの起こっていない元の状態の標識DNAの測定値の変化をまとめたのが下記表1である。

表 - 1

5

	理論値（当初の測定値を1としたときの比）		
	全てが正常遺伝子	1/2が変異遺伝子	全てが変異遺伝子
従 来 法	0.048	0.091	1
本 発 明 法	0.048	0.512	1

10 表1から分かるように、本発明方法では試料中の変異を検出しようとする遺伝子のすべてが正常である場合と、1/2が変異遺伝子である場合と、全てが変異遺伝子の場合とで測定値にそれぞれ約0.5ずつの差があり、明確にこれらを識別することができるが、従来法（ニコラス法）では全てが正常遺伝子の場合と1/2が変異遺伝子の場合との間に測定値の差が0.043しかなくこれらを明確に識別することができない。また、本発明方法によれば、変異遺伝子の存在割合と測定値との間に比例的相関関係を生じることが理論的に認められる。

20 従って、本発明の核酸の識別方法によれば、正常遺伝子と変異遺伝子との存在比に関係なく変異の有無を検出することができ、また試料中に存在する正常遺伝子と変異遺伝子との比と、コンペティティブハイブリダイゼーションの結果生じる固相担体に結合可能な標識物と検出可能な標識物との両方を持つ分子を定量した測定値との間に比例的相

25

関関係が得られ、上記測定値から、それらの存在比を比較的容易に算出することができるものであり、更に複数の検体DNAの特定遺伝子について、それぞれ試料DNA、標準DNAとすることにより、これら遺伝子の同一性を調べることが可能である。

このように、本発明の核酸の識別方法では、まず検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸增幅用プライマーを用いて、検体中の目的核酸の特定領域内の遺伝子增幅を行う。

この場合検体としては、ヒトより得られる血液、組織病片等、あるいは糞尿などの排泄物等が挙げられる。更に、出生前診断を行う場合、羊水中に存在する胎児の細胞や試験管中の分裂卵細胞の一部を検体とすることもできる。また、これらの検体は直接又は必要に応じて遠心分離操作等により沈渣として濃縮した後、例えば、酵素処理、熱処理、界面活性剤処理、超音波処理、或いはこれらの組み合わせ等による細胞破壊処理を予め施したものを使用することができ、この場合前記細胞破壊処理は、目的とする組織由来のDNAを顕在化せしめる目的で行なわれるものである。なお、細胞破壊処理の具体的な方法は、PCRプロトコルスアカデミック プレス インク P14、P352 (1990) (PCR PROTOCOLS, Academic Press Inc., P14, P352 (1990)) 等の文献に記載された公知の方法に従って行なうことができ、また検体中のDNA量はトータル量で1~100 μ g程度

であることが好ましいが、 $1 \mu g$ 以下でも十分増幅可能である。

次に、上記目的核酸増幅用プライマーは、検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとかなるものである。この場合、検出可能な標識又は固相担体に結合可能な部位が導入される位置は、プライマーの伸長反応の効率に大きく影響を与えないところであればよく、好ましくは 5' 末端付近の水酸基部分、塩基部分或いはリン酸ジエステル部分の活性基が挙げられる。

上記検出可能な標識物としては非放射性、放射性物質のどちらを用いてもよいが、好ましくは非放射性物質が用いられる。非放射性の標識物としては、直接標識可能なものとして蛍光物質 [例えばフルオレッセイン誘導体 (フルオレッセインイソチオシアネート等)、ローダミン及びその誘導体 (テトラメチルローダミンイソチオシアネート等)] 、化学発光物質 (例えばアクリジン等) や遅延蛍光を発する物質 (DTTA : ファルマ社製) 等が挙げられる。

また、標識物と特異的に結合する物質を利用すれば間接的に標識物を検出することができる。こうした場合の標識物としては、ビオチン、リガンド、特定の核酸或いは蛋白、ハプテン等が挙げられ、ビオチンの場合にはこれに特異的に結合するアビジン或いはストレプトアビジンが、ハプテンの場合はこれに特異的に結合する抗体が、リガンドの場合にはレセプターが、特定の核酸或いは蛋白の場合はこれと

特異的に結合する核酸、核酸結合蛋白或いは特定の蛋白と親和性のある蛋白等が利用できる。

上記ハプテンとしては2,4-ジニトロフェニル基を有する化合物やジゴキシゲニンを使うことができ、更にはビオチン或いは蛍光物質等もハプテンとして使用することができる。これらの標識物はいずれも単独又は必要があれば複数種の組み合わせで公知の手段（特開昭59-93099号、特開昭59-148798号、特開昭59-204200号各公報参照）により、導入することができる。なお、検出可能な標識と固相に結合可能な部位とは同一であってもよい。

この目的核酸增幅用プライマーを上記検体に加えることにより、検体中に検出すべき目的核酸が存在すれば、プライマーの伸長反応に基づく遺伝子増幅反応が起こる。

この場合、プライマーの伸長反応は、4種類のヌクレオチド三リン酸（デオキシアデノシン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸及びチミジン三リン酸（これらの混合物をdNTPということもある））を基質として該プライマーに取り込ませることにより行なわれる。

この伸長反応を行なう場合、通常核酸鎖を増幅するため上記単位核酸及び核酸伸長酵素を含む増幅反応試薬が用いられ、この場合核酸伸長酵素としてはE.coliDNAポリメラーゼI、E.coliDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T4DNAポリメラーゼなどの任意のDNAポリメラーゼを用いることができるが、特にTaq DNAポリメラーゼ、Tth

DNA ポリメラーゼ、Vent DNA ポリメラーゼ等の熱安定性 DNA ポリメラーゼを用いることが好ましく、これによりプライマーによる標的配列認識の特異性を高め、迅速かつ特異的に遺伝子増幅反応を行なうことができる（詳細は特

5 開平1-314965号公報及び同1-252300号公報参照）。

また、この反応を行なう際、反応溶液の水分の蒸発を防止するためオイルを添加することができる。この場合、このオイルは水と分配可能で、かつ水より比重の軽いものであれば何れのものも使用することができ、具体的にはシリコンオイル、ミネラルオイル等が例示される。また、遺伝子増幅装置によつては、このような媒体を必要としないものもあり、このような遺伝子増幅装置を用いてプライマーの伸長反応を行うこともできる。

10 このように、上記核酸増幅用プライマーを用いて伸長反応を繰り返すことにより、検体中の核酸を効率的に増幅させることができる。なお、この遺伝子増幅反応を行なう条件等の具体的な方法については、実験医学、羊土社、8, No. 9 (1990)、PCR テクノロジー ストックトン プレス (1989) (PCR Technology, Stockton press (1989)) 等の文献に記載された公知の方法に従つて行なうことができる。

15 次に、上記遺伝子増幅の結果得られた標識 DNA を試料 DNA とし、この試料 DNA に該試料 DNA との同一性を識別したい非標識の DNA 標品を標準 DNA として等モル以上加え、20 コンペティティブハイブリダイゼーションを行う。

この場合、上記同一性を識別しようとする非標識の標準DNAは、試料DNAと両末端とも等しいものが理想的であるが、必ずしも両末端が完全に等しいものでなくともよく、後述する実施例5では両末端とも3baseずつ長さが異なる5 試料DNAと標準DNAとを用いているが、十分な精度の識別検査が行われている。目安としては、試料DNAと標準DNAの鎖長の違いは両末端それぞれ10塩基以内程度にとどめるのが好ましいと思われるが、これについては目的とする遺伝子の配列等によって若干異なるものと思われる。

10 このような非標識標準DNAは、上述した遺伝子の増幅反応に用いたプライマーと同じ塩基配列で非標識のプライマーを用い、正常遺伝子の増幅反応により調製することができる。また、そのようにして増幅した遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、大腸菌等を利用して大量に調製するこ15 ともできる。更に、正常遺伝子を多数連結させたものをプラスミドに導入し、大量調製を容易にすることもできる。あるいは、遺伝子増幅を利用しないで天然の遺伝子から酵素的に直接切り出してもよく、また場合によっては化学合成によって調製することも可能である。

20 ここで、非標識標準DNAを多数連結させたものをプラスミドに導入するためには、増幅に用いる2本のプライマーの5'側に、標準遺伝子を同一方向に連結させるために用いる制限酵素認識配列、非標識DNAを切り出すために用いる制限酵素認識配列を導入する。この場合、標準DNAを同一方向に連結させる制限酵素認識配列は、非対称配列を切斷末25

端に残すものが好ましく、さらには 8 塩基を認識する SfiI 等が好ましい。また、この認識配列は、標準 DNA 中に存在しないものを使用しなければならない。一方、標準 DNA を切り出すための制限酵素認識配列は、平滑末端を残すものが好ましいが、その他の末端を残すものでもよい。また、この認識配列は標準 DNA 中に存在しないものを選ぶ必要がある。更に、DNA を運搬するベクターとしては、プラスミド、ファージ等任意のものを用いればよいが、大量調製等に適している pUC118 等の大腸菌内で増幅し得る多コピーのものが好ましい。

非標識標準 DNA をこれを導入したプラスミドから切り出す具体的方法としては、まず標準 DNA とする配列を、2 本のプライマーの 5' 側に標準 DNA を同一方向に連結させるために用いる制限酵素認識配列及び非標識 DNA を切り出すのに用いる配列を有するプライマーにより増幅し、同一方向に連結させるための制限酵素で切断する。これをライゲーションすることにより、標準 DNA が同一方向にいくつも連なった構造となる。これをベクターに導入することにより同一方向に標準 DNA が連結したプラスミドを得ることができる。このプラスミドを標準 DNA の切り出しに用いる制限酵素で処理することにより、標準 DNA を得ることができる。

ここで、連結の数は多い方が好ましいが、プラスミドの安定性等の条件により 10 個～数十個が適当と思われ、それに関しては標準 DNA の配列によっても異なる。

次いで、本発明では上記方法により予め調製しておいた

非標識標準DNAと標識試料DNAとのコンペティティブハイブリダイゼーションを行う。コンペティティブハイブリダイゼーションの際には、上記両DNAを変性する必要があるが、変性方法は熱による方法あるいはアルカリによる方法が好ましい。また、両DNAを混合する時期は変性直前でもよいし、変性後であってもよい。ここで、本発明方法においては、標識試料DNAに対して非標識標準DNAを当モル以上加える必要があり、通常は5~20倍モル程度に過剰に加えることが好ましいが、DNAの鎖長、塩基配列及び変異の程度等に応じて最適条件は異なる。

更に、コンペティティブハイブリダイゼーションにおいては、溶液中の塩濃度が最適になるように調整する必要があり、それには鎖長によるところが大きい。一般に、ハイブリダイゼーションにおいては、SSC (20XSSC: 3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸ナトリウム) やSSPE (20XSSPE: 3.6M 塩化ナトリウム, 0.2M リン酸ナトリウム, 2mM EDTA) が使われており、本法でもこれらの溶液を好適な濃度に希釈して使用することができる。

コンペティティブハイブリダイゼーションは上記の方法で変性した標識試料DNAと非標識標準DNAとを混合し、高温から徐々に温度を下げるにより達成することができる。この場合、温度条件については、ハイブリダイゼーションを行うDNA鎖長や塩基配列及び変異塩基配列と正常塩基配列との違いに応じて適宜最適条件が設定されるが、通常は98~58℃までの範囲で3~10分間に1℃の速度で温

度を下げる条件を目安とすればよい。

次に、コンペティティブハイブリダイゼーション生成物につき、ED - PCR 法（特開平 1 - 31496 号並びに同 1 - 252300 号公報、J.Clin.Microbiol. 30, 1728 (1992) 等参照）の原理に基づいて測定を行う。即ち、ED - PCR 法においては、二本鎖核酸のそれぞれの鎖にそれぞれ異なる標識（場合によっては同じ標識でもよい）が存在する場合にのみ、その二本鎖核酸の存在をシグナルとして示すことができる。従って、上記コンペティティブハイブリダイゼーション生成物においては、標識試料 DNA と非標識標準 DNA との間で鎖間の組み換え頻度が高いほどシグナルは低くなる。つまり、試料中に目的とする領域内において非標識標準 DNA と同じ塩基配列を含む割合が多いほどシグナルは低くなる。また、必要に応じて試料 DNA の一方の鎖のみに標識を導入し、標準 DNA のそれと相補的な鎖に標識を導入しておくことによって、試料中の DNA と標準 DNA との塩基配列が同じ場合に、つまり両 DNA の間で組み換えが起きた時にシグナルを発生させることもできる。

このように、上記ハイブリダイゼーション生成物の測定を行い、該測定結果から同一性の識別を行う（変異遺伝子の有無並びにその正常遺伝子に対する存在比又は試料 DNA、標準 DNA 間で塩基配列の相違の有無並びに相違の程度を求める）が、この場合、測定は使用する標識物質に応じて一般的手法を用いればよい。例えば、標識物質がラジオアイソトープであればそのまま活性を測定すればよく、また標

識物質が蛍光性物質であれば、そのまま蛍光光度計を用いて強度を測定すればよい（特開平1-252300号公報参照）。

一方、プライマーに直接検出可能な標識以外の標識を導入した場合には、その標識を間接的に測定するための試薬が用いられる。この場合、この測定試薬としては、例えば標識がビオチンである場合にはアビジン又はストレプトアビジンと酵素との結合体等が、標識がハプテンである場合にはハプテンと特異的に結合する抗体に酵素を結合させた抗体-酵素結合体、該酵素の基質等が用いられ、これら試薬を用いることにより該試薬と標識とが反応して、色的又は蛍光的手段により検出可能な成分を得ることができる。なお、これら試薬に用いられる酵素、基質としては、酵素が β -D-ガラクトシダーゼの場合、基質として2-ニトロフェノール、 β -D-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド等、酵素がペルオキシダーゼの場合、基質として3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオニックアシド、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、1,2-フェニレンジアミン等、酵素がアルカリ fosfatazeの場合、基質として4-メチルウンベリフェリルfosfate、NADP、4-ニトロフェニルfosfate等、酵素がグルコース-6-リン酸脱水素酵素の場合、基質としてグルコース、NAD等、また酵素がアルコール脱水素酵素である場合、基質としてエタノール、NAD等を用いることができる。

なお、上記ハイブリダイゼーション生成物の測定は、該

ハイブリダイゼーション生成物を固相担体にトラップして行われるが、この場合固相担体としては上記プライマーに導入された固相担体結合部位と特異的に結合可能な固相担体が用いられ、具体的には、マイクロタイターウェルに該部位が特異的に結合するように処理したもの用いることができる。
5

上記測定の結果、試料中の目的とする遺伝子領域に変異が存在しない場合は、前に図1～図3の模式図を用いて説明したように、過剰の非標識標準DNAで希釈され、測定値は著しく低下し、一方変異のある遺伝子のみの場合は非標識標準DNAにより希釈されないため高い測定値が得られる。また、1/2が変異遺伝子である場合（対立遺伝子の一方のみに変異がある場合）には、変異が存在しない場合と変異遺伝子のみの場合との中間の測定値が得られ、従って、こののような検体も容易に識別することができる。
10
15

更に、予め変異遺伝子と正常遺伝子との存在比が異なる種々の試料DNAについて測定を行い、変異遺伝子と正常遺伝子との存在比と測定値との関係を示す検量線を作成しておくことにより、実際の測定値から試料中の変異遺伝子と正常遺伝子との存在比を容易に決定することができる。
20

また、HLAのタイピングを従来法（PCR-SSO法（Randall, K.ら, *Nature*, 324, 163 (1986)、PCR-RFLP法（Maeda, N.ら, *Tissue Antigens*, 34, 290 (1989)、PCR-SSP法（Olerup, O.ら, *Tissue Antigens*, 39, 225 (1992)で行った場合、試料の対立遺伝子がホモであるとの結果が
25

出ても、未知のタイプとのヘテロである可能性もあり、正確な判断ができない危険性があった。しかしながら、本法を用いることにより、それがホモであるか否かを結論づけることができる。更に、1つの検体DNAを標識プライマーで増幅したものを標識試料DNAとし、別の検体DNAを同じ配列を有する非標識プライマーで増幅したものを非標識標準DNAとし、本法に従って分析することにより、2つの検体DNAの対立遺伝子の両方が完全に一致するか否かを判断することが可能となり、移植手術における最終確認法として有効な手段となり得る。

次に、本発明の核酸の識別用検査セットは、上記本発明の核酸の識別方法を用いて核酸の同一性を識別する検査を行なうもので、上述したように、目的核酸の特定領域の遺伝子を増幅するための遺伝子増幅用プライマーと、該プライマーにより増幅された遺伝子増幅物との同一性を識別したい非標識の標準DNAとを具備してなるものである。

ここで、上記目的核酸の特定領域の遺伝子を増幅するための遺伝子増幅用プライマーは、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担体と結合可能な部位を導入したプライマーとから構成されたもので、上記検出可能な標識物及び固相担体と結合可能な部位は、上記本発明の核酸の識別方法で説明したこれらと同様のものであり、また上記非標識の標準DNAも上記本発明方法で説明したものと同様のものである。

本発明の核酸の識別用検査セットは、上記本発明の核酸

の識別方法に従って、必要により細胞破壊処理等の前処理を施した検体と上記增幅用プライマーとを混合し、增幅反応試薬を添加して、検体中の目的核酸の特定領域の遺伝子增幅を行ない、これに上記非標識標準DNAを加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行なった後、得られたハイブリダイゼーション生成物を担体にトラップして、両DNA間での組み換えの度合いを測定するものであり、この場合上記增幅反応試薬及び担体としては公知のもの、具体的には上記本発明の核酸の検出方法で説明したものと同様のものを使用することができ、これらと組み合わせて本発明の核酸の識別用検査セットとすることができる。
10

更に、本発明検査セットを用いて核酸の識別検査を行う場合、上記本発明の核酸の識別方法で説明した検体前処理用の細胞破壊試薬、増幅反応生成物を洗浄するための洗浄液、反応溶液の水分の蒸発を防止するためのオイル及び標識を間接的に測定するための試薬等を用いることができ、これらと組み合わせて本発明の核酸の識別用検査セットとすることもできる。
15

次に、実施例、比較例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。
20

[実施例 1]

ヒト β グロビン遺伝子の6番目のコドンに存在するGlu (GAG) → Val (GTG) の点突然変異の検出を以下のようにして行なった。

25 標的遺伝子としては、下記增幅用プライマーPBG-1、PG

– 2 で増幅される約 200 bp の DNA 断片を用いた。

P B G – 1

5'GGGTTGGCCAATCTACTCCCCAG

5 PG – 2

5'CAACTTCATCCACGTTCAACC

PCR 法による DNA の増幅は、下記 PBG – 1 – NH₂ (100ng)、
PG – 2 – NH₂ (100ng) とテンプレートとして下記 pBGN
10 (1ng) 或いは下記 pBGM (1ng) とを用い、200 μM の
4 種の dNTP 存在下、100 μl の 67mM トリス – 塩酸緩衝
液 (pH8.8)、16.6mM (NH₂)₂SO₄、6.7mM MgCl₂、10mM
の 2 – メルカプトエタノール及び 2 Unit の Tth DNA ポ
リメラーゼを含む反応溶液中で行なった。反応は 94 °C, 5 分
15 間加熱後、94 °C, 30 秒、50 °C, 30 秒、72 °C, 60 秒のサイク
ルで 30 回繰り返した。この反応溶液を非標識標準 DNA 溶
液とした。

一方、下記 PBG – 1 – Bio (100ng) に、下記 PG – 2
– DNP (100ng) と pBGN 或いは pBGM (1ng) を加え、
20 200 μM の 4 種の dNTP 存在下で上記と同様の条件で PCR
法にて増幅し、標識試料 DNA 溶液とした。

P B G – 1 – Bio

Biotin – 5'GGGTTGGCCAATCTACTCCCCAG

25 PG – 2 – DNP

DNP - 5'CAACTTCATCCACGTTCA

PBG - 1 - NH₂

NH₂ - 5'GGGTTGGCCAATCTACTCCCAG

PG - 2 - NH₂

5 NH₂ - 5'CAACTTCATCCACGTTCA

pBGN

正常ヒトβ-グロビン遺伝子を持つプラスミド

pBGM

6番目のアミノ酸に一塩基変異 (Glu (GAG) → Val (GTG))
10 を持つプラスミド

標準DNA溶液及び試料DNA溶液中の増幅物は、アガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認し、ほぼ同量生成していることを確認した。

15 コンペティティブハイブリダイゼーション

標準DNA溶液と試料DNA溶液とを混ぜ、水を加え30 μlとした。これに20×SSC (20×SSC: 0.3M クエン酸ナトリウム、pH 7.0、0.3M 塩化ナトリウム) 6 μlを加え、ミネラルオイルを重層した。これを98 °C, 10分間加熱後、遺伝子増幅装置 (サーマルサイクラー PJ2000, パーキンエルマー社) を用いて1 °C/6~10分の速さで58 °Cまで徐々に温度を下げた。この反応液のうち20 μlを取り、検出に用いた。なお、非標識標準DNA溶液としてpBGNに由来するものを用い、標識試料DNA溶液としてpBGN或いはpBGMに由来するもの又は両者の等量混合物を用いた。ま

た、非標識標準DNA溶液と標識試料DNA溶液との量比を変えて検討した。

検討

上記コンペティティブハイブリダイゼーションの結果生じた両鎖の5'末端にビオチンとDNPの両標識を同時に有する分子を検出する。

ストレプトアビシンを固相化したマイクロタイタープレートに抗DNPマウスIgG-アルカリ性フォスファターゼ複合体を含む100μlの50mMトリス塩酸(pH7.5)、0.15MのNaCl、0.05%のTween20を加える。これにハイブリダイゼーション溶液20μlを加え、混和後、25℃で30分間インキュベートした。これを300μlの同溶液で3回洗った後、4mg/mlのp-ニトロフェニルリン酸を含む1Mジエタノールアミン(pH9.8)及び0.5mM MgCl₂を100μl加え、25℃で1時間発色反応を行なった。黄色の発色を405nmの吸光度でプレートリーダーを用いて測定した。なお、ハイブリダイゼーションは、同時に2本のチューブで行ない、その測定結果を平均した。

また、標準DNA溶液、試料DNA溶液の混合比を変えて、コンペティティブハイブリダイゼーションを行ない、その結果生じた「一方にDNP、他方にビオチン標識を持つ2本鎖DNA」を検出した。結果を表2に示す。

表 - 2

標準DNA (非標識)	試料DNA (標識)	標準:試料 比率	吸光度 (A405)
5 正 常 (pBGN 由来)	正常 (pBGN)	20 : 1	0.120
	正常 (pBGN)		
	変異 (pBGM) 混合	20 : 1	0.418
	変異 (pBGM)	20 : 1	0.988
	正常 (pBGN)	10 : 1	0.202
	正常 (pBGN)		
	変異 (pBGM) 混合	10 : 1	0.511
	変異 (pBGM)	10 : 1	1.068
	正常 (pBGN)	5 : 1	0.369
10	正常 (pBGN)		
	変異 (pBGM) 混合	5 : 1	0.631
	変異 (pBGM)	5 : 1	1.150

〔比較例〕

従来法により核酸の変異検出を行った。即ち、標識プライマーで調製した標準DNA溶液に対して非標識プライマーで調製した過剰量の試料DNA溶液を加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行なった（標識DNAと非標識DNAとのモル比が1:20になるように両溶液を混合した）。なお、その他の条件等は実施例1と同様とした。結果を表3に示す。

表 - 3

標準 DNA	試 料	吸光度 (A405)
正 常 (pBGN)	正 常	0.16
	正常+変異	0.20
	変 異	1.02

5

表 3 に示したとおり、従来法は正常 DNA と正常 DNA + 変異 DNA との間に吸光度で 0.04 の差しかなく、両者の区別が上記実施例 1 の本発明方法に比べて極めて困難であった。

[実施例 2]

10 ヒト c - H - ras 遺伝子の 12 番目のコドンに存在する GGC (Gly) → GTC (Val) の検出を以下のように行なった。この場合、下記の pSK - 2 或いは pKY - 1 を下記の PHR - 1、PHR - 2 のプライマーを用いて増幅して得られた変異の位置を含む約 110 bp の DNA 断片を実験に用いた。

15 下記プライマー - PHR - 1 - DNP (100 ng)、PHR - 2 - Bio (100 ng) を用い、pSK - 2 或いは pKY - 1 (1 ng) をテンプレートとして実施例 1 と同様に増幅反応を行ない、標識試料 DNA 溶液とした。一方、下記のプライマー - PHR - 1 - NH₂、PHR - 2 - NH₂ で pSK - 2 を増幅して非標識標準 DNA 溶液を調製した。なお、増幅物はアガロースゲル 20 電気泳動により生成量及び鎖長を確認した。

PHR - 1

5' ATGACGGAATATAAGCTGGTG

25 PHR - 2

5' C T C T A T A G T G G G G T C G T A T T C

PHR - 1 - DNP

DNP - 5' A T G A C G G A A T A T A A G C T G G T G

PHR - 2 - Bio

5 Bio - 5' C T C T A T A G T G G G G T C G T A T T C

PHR - 1 - NH₂

NH₂ - 5' A T G A C G G A A T A T A A G C T G G T G

PHR - 2 - NH₂

NH₂ - 5' C T C T A T A G T G G G G T C G T A T T C

10 pSK - 2

正常ras遺伝子を持つプラスミド (T.Sekiya, Gann, 74, 794 (1983), JCRB (Japan Cancer Research Resources Bank) より入手可

pKY - 1

15 12番目のコドンに変異のあるプラスミド (M.H.Kraus and Y.Yuasa, Nature, 303, 775 (1983), JCRB (Japan Cancer Research Resources Bank) より入手可

コンペティティブハイブリダイゼーション～検出

20 標識試料DNA溶液と非標識標準DNA溶液とを混合し、水を加えて30μlとしたものに、20×SSCを6μl加え、実施例1と同様に検出を行なった。なお、コンペティティブハイブリダイゼーションは同時に2本のチューブで行ない、その結果の平均値を示した。その結果を表4に示す。

表 - 4

標準DNA溶液	試料DNA溶液	試料:標準比	吸光度(A405)
正 常 (pSK - 2)	正 常	3 : 20	0.122
	正常+異常	3 : 20	0.338
	異 常	3 : 20	0.575

表2,4の結果から、本発明の核酸の識別方法によれば、対立遺伝子の両方が正常な場合、一方に変異が存在する場合、両方共に変異が存在する場合で、それぞれ明確に吸光度が変化し、これらを明確に識別し得ることが確認された。これに対し、従来法（ニコラスらの方法）では、上記表3に示されているように、対立遺伝子の両方が正常の場合と一方が正常で他方に変異が存在する場合とに明確な差がなく、これらを識別することが困難であった。

[実施例3]

正常細胞中に特定の遺伝子が変異した細胞が混在する状態のモデルとして、正常DNAに極微量の変異DNA（ガン遺伝子）を加え、本発明法により検出可能かどうかについて以下の通り実験した。

正常DNAとしてヒトc-H-ras遺伝子（pSK-2から取得）、変異DNAとしてヒトc-H-ras遺伝子の12番目にGGC (Gly) → GTC (Val) の変異が起きたもの（pKY-1から取得）を用いて、正常DNAに対して変異DNAの割合が0%、5%、10%、25%、50%、100%になるよ

うにサンプルを調製した。これらのサンプルに対して PHR - 1 - DNP 並びに PHR - 2 - Bio の 2 種のプライマーを用いて増幅反応を行ない、標識試料 DNA 溶液を調製した。一方、正常 DNA に対して PHR - 1 - NH₂ 並びに PHR - 5 2 - NH₂ の 2 種のプライマーを用いて同様に増幅反応を行ない、非標識標準 DNA を調製した。

標識試料 DNA 溶液と非標識標準 DNA 溶液とを溶液中の DNA のモル比が 20 : 1 になるように両溶液を混合し、熱変性後、アニーリングを行ない、実施例 1 と同様に検出を行なった。結果を表 5 に示す。また、正常 DNA に対して変異 DNA の割合が 100 % の場合の吸光度を 1 とし、それぞれの比をグラフに示した。これを図 4 に示す。

表 - 5

正常遺伝子に対する異変 DNA の割合	吸光度 (A405)
0 %	0.045
5 %	0.079
10 %	0.101
25 %	0.146
50 %	0.304
100 %	0.563

表 5 及び図 4 の結果から、正常 DNA に対する変異 DNA の割合が低いものでも吸光度に明確な差が見られ、また変異 DNA の割合と吸光度との間の相関が明らかであり、変異 DNA 存在量が 10 % 程度のものでも容易に検出可能である

ことが確認された。従って、DNA診断により血液、糞尿中の組織から微量のガン細胞を検出する場合でも本法に従い検査すれば、変異DNAを持つ細胞の有無のみならず変異DNAを持つ細胞の存在比も概算することができる事が確認された。
5

[実施例4]

囊胞性線維症の遺伝子診断

ヒトCFTR遺伝子 (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator gene) は囊胞性線維症の原因遺伝子とされている。この遺伝子の対立遺伝子両方に異常がある場合にのみ発病し、一方にのみ異常がある場合には本人は発病しないが子孫にその因子が伝わることとなる。従って、CFTRの遺伝子診断のためには、その遺伝子が対立遺伝子の両方に変異を持った場合、一方にのみ変異を持つ場合、両方とも正常な場合を区別する必要がある。
10
15

また、この遺伝子にみられる変異のうち約7割は、508番目のフェニルアラニンが欠損したものであるが、それ以外にも多くの種類の変異の存在が報告されており、その位置、種類は多岐にわたり不特定である。

20 本法が目的とするのは、過去の報告からみて変異の頻度の高い領域に関して、その対立遺伝子の両方ともが正常か、一方にのみ変異が存在するか、あるいは両方とも変異しているかを同定することである。

本実施例においては、下記表6に示した代表的な4種の変異について実験を行なったが、これ以外の変異についても
25

容易に検出系を作製することは可能である。また、本実施例では各エキソンについて1種類の変異のモデルのみを示したが、増幅物中に本例以外の変異が存在する場合にも検出可能であることはいうまでもない。

表-6

exon	変異の種類
exon4	621 + 1G > T
exon10	Δ F508
exon11	G551D
exon21	N1303K

①エキソン4の検査

エキソン4に存在する代表的な変異は621 + 1G > Tと呼ばれるものである。この変異621 + 1G > Tの検出を下記の通り行った。

試料の調製

ヒト染色体DNAをテンプレートとしてエキソン4の一部を増幅し、下記プラスミド(CF04P101, CF04M101)に組み込んだ。

20

CF04P101

5' ATTGTGAGGGACACTGCTCCTACACCCAGCC

CF04M101

5' TACGATACAGAATATATGTGCCATGGGGCC

PCR 法による増幅は、CF04P101 - OH (100ng)、CF04M101 - OH (100ng) とテンプレートとして正常ヒト染色体 1 μ g を用い、200 μ M の 4 種の dNTP 存在下、100 μ l の 67 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH8.8)、16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、6.7 mM MgCl_2 、10 mM の 2 - メルカプトエタノール及び 2 Unit の Tth DNA ポリメラーゼを含む反応液で行なった。反応は 94 °C, 5 分間加熱後、94 °C, 30 秒、60 °C, 30 秒、72 °C, 60 秒のサイクルで 35 回繰り返した。

反応液をアガロース電気泳動で分離し、約 230 bp のフラグメントを得た。これを pUC119 の SmaI site に導入した。塩基配列を確認し、pEX4N とした。

変異遺伝子は上記 pEX4N をテンプレートとし、上記 CF04P101, CF04M101 及び下記 CF04621P, CF04621M の 4 種のプライマーを用いて overlap extention mutagenesis 法 (文献、Gene, (1989) 77, 51 - 59, Steffan N. Ho et al.) により点突然変異を生じさせ、621 + 1G > T の遺伝子を得た。塩基配列を確認し、pEX4M とした。

CF04621P

20 GATTTATAAGAAGTTAACATACCTTCCTTGCACAG

CF04621M

AAGTATTAACTTCTTATAAAATCAAAC

変異遺伝子の検出

25 非標識標準 DNA の調製は以下のように行なった。

CF04P101 - NH₂ (100ng) 及び CF04M101 - NH₂ (100ng) と上記 pEX4N (1ng) を用い、前記試料の調製で用いたものと同様の反応液組成により PCR 増幅を行なった。

一方、標識試料DNAは、CF04P101 - Bio (100ng)、
5 CF04M101 - DNP (100ng) を用い、

正常 : pEX4N 1ng

対立遺伝子の一方が変異 : pEX4N 0.5ng

pEX4M 0.5ng

対立遺伝子の両方が変異 : pEX4M 1ng

10 をテンプレートとして PCR 増幅を行ない調製した。

標準DNA溶液及び試料DNA溶液中の増幅物は、アガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認し、ほぼ同量生成していることを確認した。

コンペティティブハイブリダイゼーション

15 試料DNA溶液と20倍量の標準DNA溶液を実施例1の条件で混和し、98℃, 10分加熱後、1℃/10分の速度で68℃まで徐々に温度を下げた。この反応液のうち20μlを取り、コンペティティブハイブリダイゼーションの結果生じた両鎖の5'端にビオチンとDNPの両標識を同時に有する分子を実施例1と同様の操作により検出した。その結果を表20 7に示す。

表 - 7

標準DNA溶液 (非標識)	試料DNA溶液 (標識)	吸光度 (A405)
正 常 (pEX4N由来)	正常 (pEX4N)	0.11
	正常 (pEX4N) 変異 (pEX4M) 混合	0.70
	変異 (pEX4M)	1.87

表7に示したように、対立遺伝子の両方が正常な場合、一方のみ変異している場合、両方とも変異している場合をそれぞれ明確に区別することができた。

②エキソン10の検査

エキソン10に関しては、最も高い頻度で出現する△F508をモデルとして、下記の通り検査を行った。

試料の調製

下記CF10P101-OH (100ng), CF10M101-OH (100ng)とヒト染色体DNA (1 μg) を用い、前述の方法でPCR増幅を行なったものを同様の方法でプラスミドに導入し、正常遺伝子を有するpEX10Nを得た。

CF10P101 -

5' GATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGG

CF10M101 -

5' CTTCTAGTTGGCATGCTTGTGACGCTTC

一方、上記CF10P101-OH, CF10M101-OHと下記

CF Δ F508U, CF Δ F508Lとの4種のプライマー及びpEX10Nをテンプレートとしてoverlap extention mutagenesis法により、Δ F508変異を有するプラスミドpEX10Mを得た。

5

CF Δ F508U

5'AAATATCATCGGTGTTCCATG

CF Δ F508L

5'CACCGATGATTTCTTTAATG

10

遺伝子変異の検出

標識試料DNAは、CF10P101 - Bio (100ng)、CF10M101 - DNP (100ng)をプライマーとし、

正常 : pEX10N 1ng

15 対立遺伝子の一方が変異 : pEX10N 0.5ng
pEX10M 0.5ng

対立遺伝子の両方が変異 : pEX10M 1ng

をテンプレートとしてPCR増幅を行なうことにより調製した。

20 非標識標準DNAは、CF10P101 - NH₂ (100ng), CF10M101 - NH₂ (1ng)及びpEX10N (1ng)を用い、PCR増幅により調製した。

上記エキソン4に関するものと同様の操作を行ない、試料DNAを分析した結果を表8に示す。表8に示されているよう 25 に、3種の遺伝子型を明確に区別することができた。

表 - 8

標準DNA溶液 (非標識)	試料DNA溶液 (標識)	吸光度 (A405)
正 常 (pEX10N 由来)	正常 (pEX10N)	0.14
	正常 (pEX10N) 変異 (pEX10M) 混合	0.89
	変異 (pEX10M)	1.74

③ エキソン11の検査

エキソン11に関しては、G551Dをモデルとした。

10 試料の調製

下記CF11P101-OH (100ng), CF11M101-OH (100ng) 及びヒト染色体DNA (1 μg) を用い、エキソン4の場合と同様の方法でPCR增幅を行なったものを同様の方法でプラスミドに導入し、正常遺伝子を有するプラスミドpEX11Nを得た。

CF11P101 -

5'GAAGGAAGATGTGCCTTCAAATTCAAGATTG

CF11M101 -

5'ATGACATTTACAGCAAATGCTTGCTAGACC

一方、上記CF11P101-OH, CF11M101-OHと下記CF11-551P-OH, CF11-551M-OHとの4種のプライマー及びpEX11Nをテンプレートとしてoverlap extension mutagenesis法により、G551D変異を持つプラスミド

pEX11Mを得た。

CF11 - 551P -

5'CACTGAGTGGAGATCAACGAGCAAGAATTCT

5 CF11 - 551M -

5'GCTCGTTGATCTCCACTCAGTGTGATTG

遺伝子変異の検出

非標識標準DNAは、CF11P101 - NH₂ (100ng), CFM101 - NH₂ (100ng) 及び pEX11N (1ng) を用い、PCR増幅により調製した。

標識試料DNAは、CF11P101 - Bio (100ng)、CFM101 - DNP (100ng) 及び

正常 : pEX11N 1ng

15 対立遺伝子の一方が変異 : pEX11N 0.5ng

pEX11M 0.5ng

対立遺伝子の両方が変異 : pEX11M 1ng

をテンプレートとしてPCR増幅により得た。

得られた非標識標準DNA及び標識試料DNAを用い、エキソン4に関するものと同様にして、遺伝子変異の検出を行なった。その結果を表9に示す。表9に示されているように、3種の遺伝子型を明確に区別することができた。

表 - 9

標準DNA溶液 (非標識)	試料DNA溶液 (標識)	吸光度 (A405)
正 常 (pEX11N由来)	正常 (pEX11N)	0.08
	正常 (pEX11N) 変異 (pEX11M) 混合	0.48
	変異 (pEX11M)	0.90

④ エキソン 21 の検査

エキソン 21 に関しては、N1303K の変異をモデルとし
た。

下記 CF21P101 - OH (100ng), CF21M101 - OH (100ng)
及びヒト染色体DNA (1 μ g) を用い前述の方法に従い、正
常遺伝子を有するプラスミド pEX21N を得た。

CF21P101 -

5'AGAGAACTTGATGGTAAGTACATGGGTGTT

CF21M101 -

5'TTAGCAGCCTTACCTCATCTGCAACTTCC

一方、上記 CF21P101 - OH, CF21M101 - OH 及び下
記 CF21 - 1303P - OH, CF21 - 1303M - OH の 4 種の
プライマー及び pEX21N をテンプレートとして overlap
extension mutagenesis 法により、N1303K 変異を
持つプラスミド pEX21M を得た。

CF21 - 1303P -

5' CATTAGAAAAAGTTGGATCCCTATGAACA

CF21 - 1303M -

5' GGGATCCAACTTTTCTAAATGTTCCAG

5

遺伝子変異の検出

非標識標準DNAは、CF21P101 - NH₂ (100ng), CF21M101 - NH₂ (100ng) 及び pEX21N (1ng) を用い、PCR増幅により得た。

10 標識試料DNAは、CF21P101 - Bio (100ng)、CF21M101 - DNP (100ng) 及び

正常 : pEX21N 1ng

対立遺伝子の一方が変異 : pEX21N 0.5ng

pEX21M 0.5ng

15 対立遺伝子の両方が変異 : pEX21M 1ng

をテンプレートとしてPCR増幅により調製した。

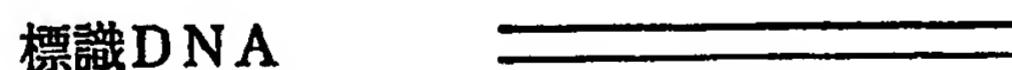
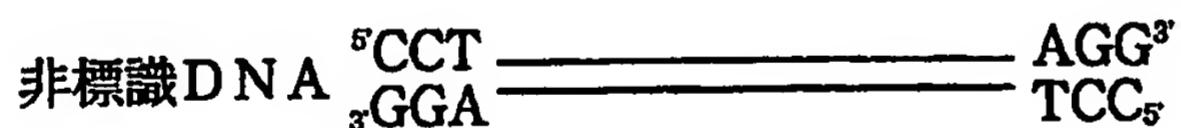
得られた非標識標準DNA及び標識試料DNAを用い、エキソン4に関するものと同様にして、遺伝子変異の検出を行なった。その結果を表10に示す。表10に示されているように、3種の遺伝子型を明確に区別することができた。

表 - 10

標準DNA溶液 (非標識)	試料DNA溶液 (標識)	吸光度 (A405)
5 正 常 (pEX21N由来)	正常 (pEX21N)	0.20
	正常 (pEX21N) 変異 (pEX21M) 混合	0.51
	変異 (pEX21M)	1.16

[実施例 5]

本法では、エキソン10の一部をタンデムに連結したプラスミドを作製し、それを制限酵素で切断することにより非標識標準DNAを得、この非標識標準DNAを用いて遺伝子の変異検出を行った。なおこの場合、非標識DNAの配列は標識DNAと完全には同一でなく、下記のように、非標識DNAの方がそれぞれの5'末端に⁵CCT³の配列を余分に有している。



20 非標識標準DNAの作製法及びそれを用いた実験

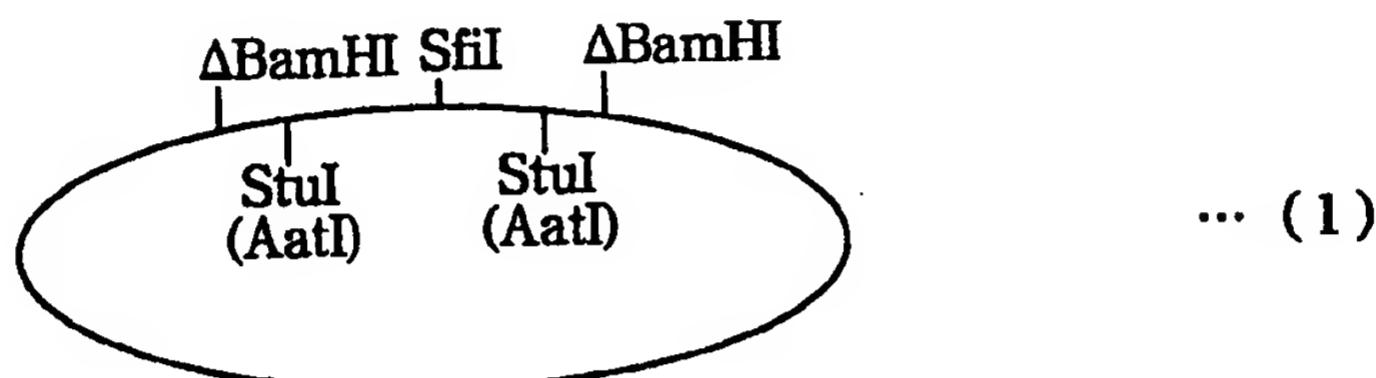
エキソン10を用いて、非標識標準DNAをプラスミドに組み込み大量調製する実験を行なった。

① pUC-Sfi/Stuの調製

5' - OH - GATCAGGCCTAAAAAGGCCT

5' - OH - GATCAGGCCTTTAGGCCT

との両オリゴヌクレオチド各5pmolをアニーリングし、これをpCU119をBamHIで切斷したものの(100ng)に挿入し、下記制限酵素地図(1)で表されるpUC-Sfi/Stuを得た。



② pUC-Sfi/Stu-EX10の調製

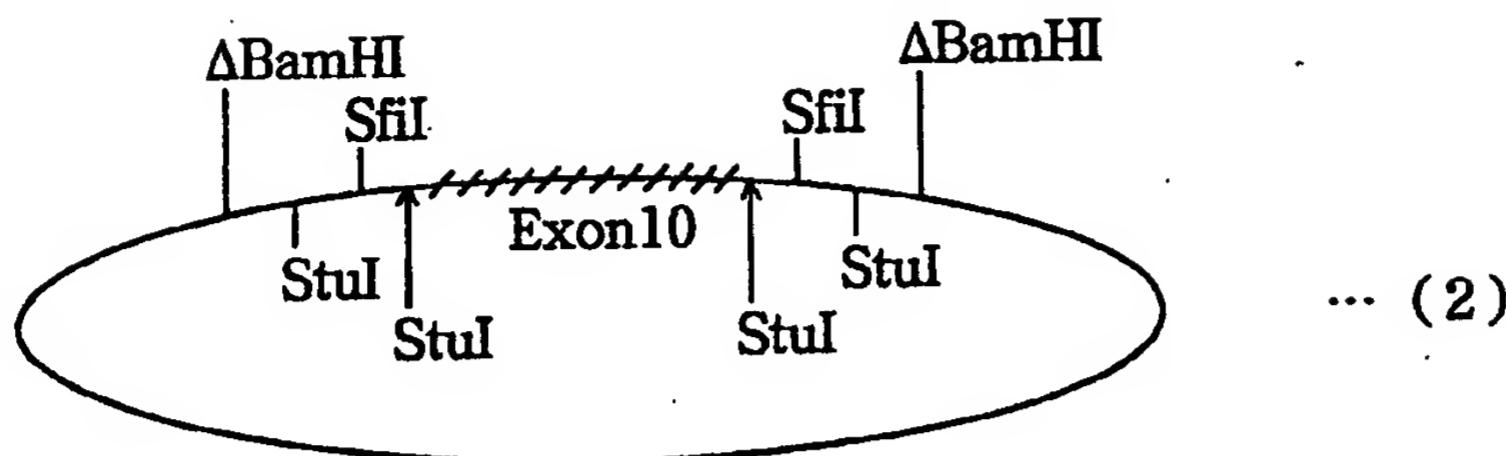
下記CF-10-LigU(100ng),CF-10-LigL(100ng)を用い、pEX10N(1ng)をテンプレートとしてPCR増幅を行なった。SfiIで切斷後、アガロースゲル電気泳動により約190bpの断片を回収した。これをSfiI切斷した上記pUC-Sfi/Stuに導入し、塩基配列を確認し、下記制限酵素地図(2)で表されるpUC-Sfi/Stu-EX10を得た。

CF-10-LigU

5'OH-TTTAGGCCTAAAAGGCCTGATTATGGGAGAACTGGA

CF-10-LigL

5'OH-CCCAGGCCTTTAGGCCTCTTCTAGTTGGCATGCTT



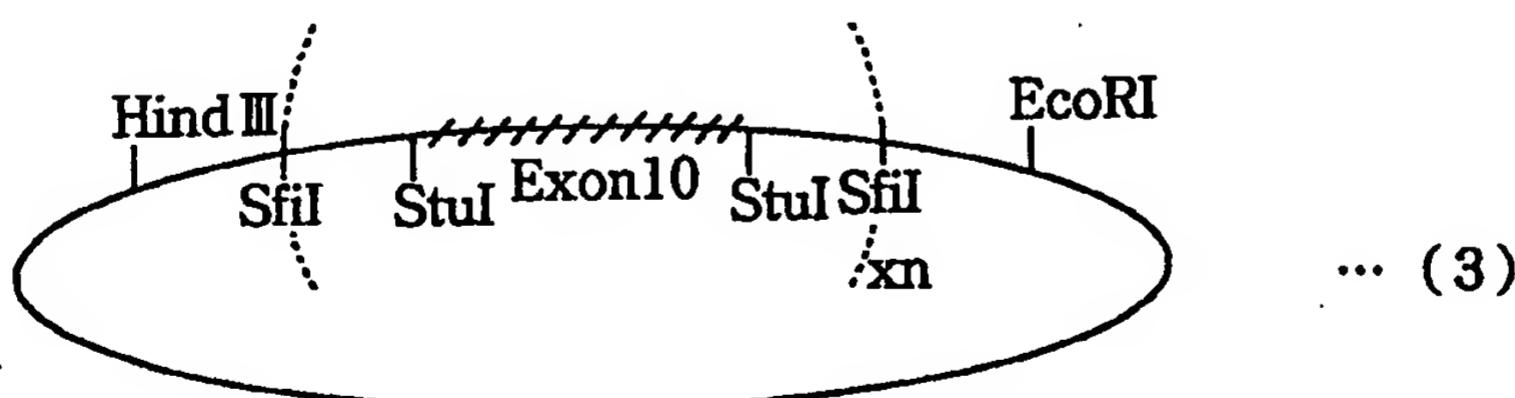
5

③ pUC - EX10Lig の調製

pUC - Sfi / Stu - EX10 300 μ g を SfiI で切斷し、約 190 bp の断片をアガロースゲル電気泳動により精製した。

10 このフラグメント 2 μ g と SfiI 切断した pUC - Sfi / Stu 10ng をリゲイション (Ligation) し、大腸菌 DH5 を形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを調製し、エキソン 10 を含むフラグメントが約 15 ヶ同じ向きに連結した下記制限酵素地図 (3) で表される pUC - EX10Lig を得た。このプラスミドを StuI (AatI) で切斷することにより、エキソン 10 を含む断片を切り出した。

20



pUC - EX10Lig を非標識標準 DNA として用いる遺伝子変異検出法

25 標識試料 DNA は、CF10P101 - Bio (100ng)、CF10M101 - DNP (100ng) を用い、テンプレートとして、

正常 : pEX10N 1ng

対立遺伝子の一方に変異 : pEX10N 0.5ng

pEX10M 0.5ng

対立遺伝子の両方に変異 : pEX10M 1ng

5 を用い PCR 法により調製した。

非標識標準DNAは、下記 (a) ~ (d) を用いた。

(a) CF10P101 - NH₂ (100ng)、CF10M101 - NH₂ (100ng)

及びテンプレートとして pEX10N (1ng) を用い、PCR 法により調製した。

10 (b) pUC - EX10Lig を StuI (AatI) で切斷したもの

(上記制限酵素地図 (3) 参照) を精製せずに用いたもの。

(c) pUC - EX10Lig を StuI (AatI) で切斷したもの
(上記制限酵素地図 (3) 参照) をアガロースゲル電気泳動
で分離し、エキソン10を含む断片を精製したもの。

15 (d) pUC - EX10Lig を EcoRI - Hind III で切斷したもの
(上記制限酵素地図 (3) 参照)。

上記各非標識標準DNA及び標識試料DNAを用い、上記実施例4と同様にして、遺伝子変異の検出を行なった。その結果を表11に示す。

表 - 11

試料DNA 非識	標準DNA (非標識) 調製法			
	a	b	c	d
正常 (pEX10N 由来)	0.07	0.14	0.15	0.84
正常 (pEX10N) 変異 (pEX10M) 混合	0.28	0.38	0.33	0.81
変異 (pEX10M)	0.74	0.86	0.72	0.78

表 11 に示したように、(b), (c) の方法で調製した標準 DNA は、(a) の PCR 法により調製したものと同等の結果を与えた。一方、(d) のものは、タンデムにつながった状態のままのものであり、コンペティションはほとんどみられない。

以上のこととは、プラスミド上にタンデムに連結したものから制限酵素により非標識標準 DNA を調製することが十分可能であることを示している。また、非標識標準 DNA は精製することなく使用可能であり、更に標識 DNA と非標識 DNA の配列が完全に同一でなく、両端に余分な配列を持つものでも十分に使用可能であることを示している。

以上実施例 1~5 から、本発明の核酸の識別方法によれば、正常遺伝子及びその変異遺伝子の有無並びに両者の比を検体から直接、短時間で検出することができる事が確認された。従って、従来困難とされていたある特定遺伝子内に存在する不特定な位置の変異の有無の検出、正常細胞中に混在する変異遺伝子を持った少量の異常細胞の検出、複数

48

の試料中の特定遺伝子の同一性を調べること等が可能となり、遺伝病の診断あるいはガンのDNA診断等に対する本発明識別方法の果す役割は極めて大である。

5

10

15

20

25

請求の範囲

1. 検体中の目的核酸の特定領域内の遺伝子を識別するに当たり、検出可能な標識物を導入したプライマーと、固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用のプライマーを用いて、検体中の目的核酸の特定領域の遺伝子増幅を行ない、その結果得られた標識DNAを試料DNAとともに、試料DNAとの同一性を識別したい非標識のDNA標品を標準DNAとし、上記試料DNAに上記標準DNAを等モル以上加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行なった後、上記検出可能な標識物と固相担体に結合可能な部位とを利用して上記試料DNAと上記標準DNAとの間で相補鎖の置換が生じた程度を測定することによって、核酸の同一性を識別することを特徴とする核酸の識別方法。

2. 試料DNAとの同一性を識別したい非標識のDNA標品が1組のプライマーを用いた遺伝子増幅法(PCR法)により調製されたものである請求の範囲第1項記載の識別方法。

3. 試料DNAとの同一性を識別したい非標識のDNA標品が宿主細胞内で増殖可能なベクターを用いた遺伝子工学的手法により調製されたものである請求の範囲第1項記載の識別方法。

4. 検体中の目的核酸の特定領域が囊胞性線維症の原因遺伝子(CFTR遺伝子)である請求の範囲第1項乃至第3項のいずれか1項に記載の識別方法。

5. 検出可能な標識物を導入したプライマーと固相担体に結合可能な部位を導入したプライマーとからなる目的核酸増幅用プライマーと、

該プライマーにより増幅された遺伝子増幅物との同一性を識別したい非標識DNA標品とを具備してなることを特徴とする核酸の識別用検査セット。

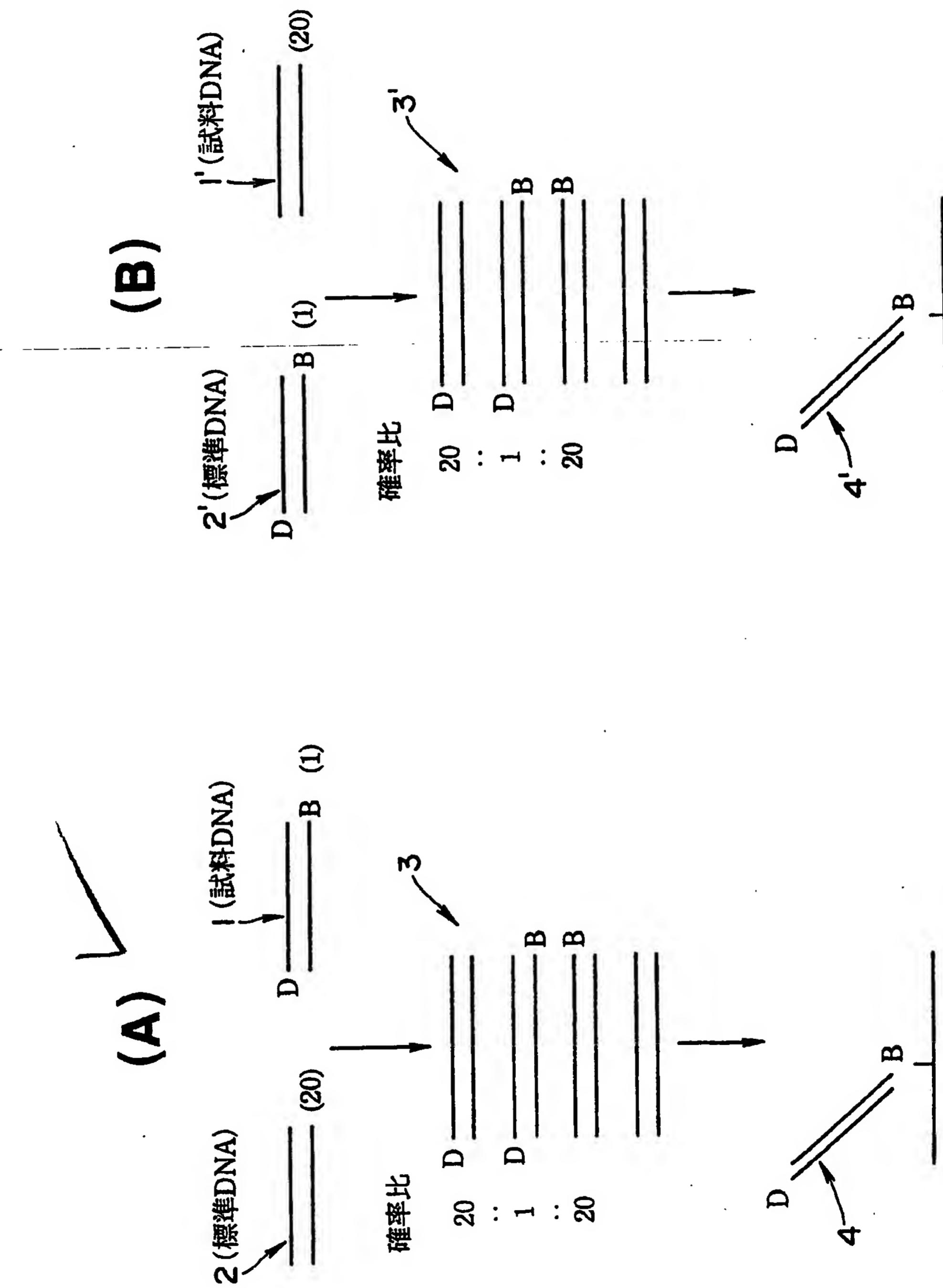
6. 検体中の目的核酸の特定領域の遺伝子を増幅するための試薬と、

ハイブリダイゼーション生成物をトラップするための担体と、

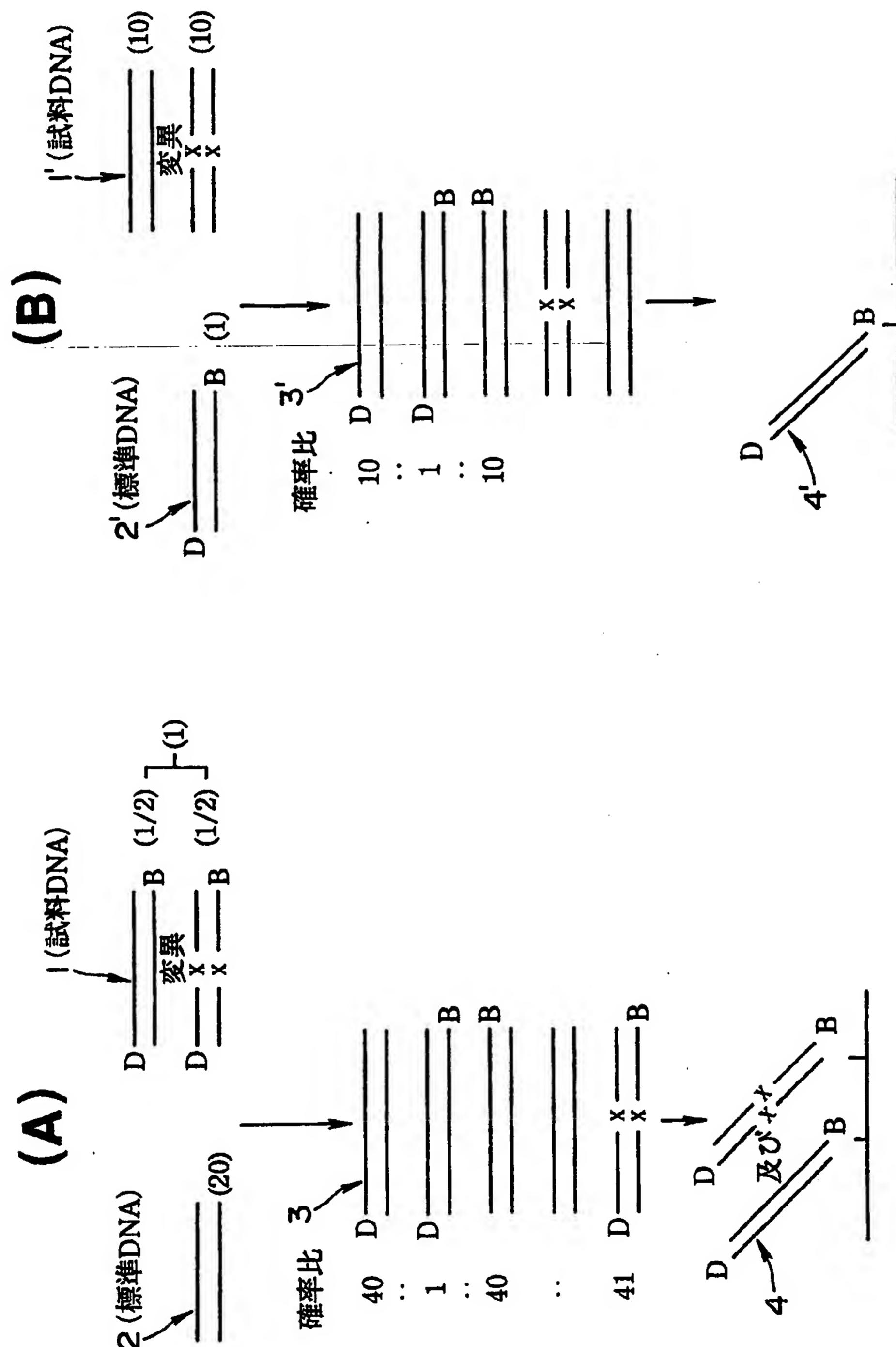
トラップされた遺伝子を検出するための試薬とを具備した請求の範囲第5項に記載の核酸の識別用検査セット。

1/4

【図1】



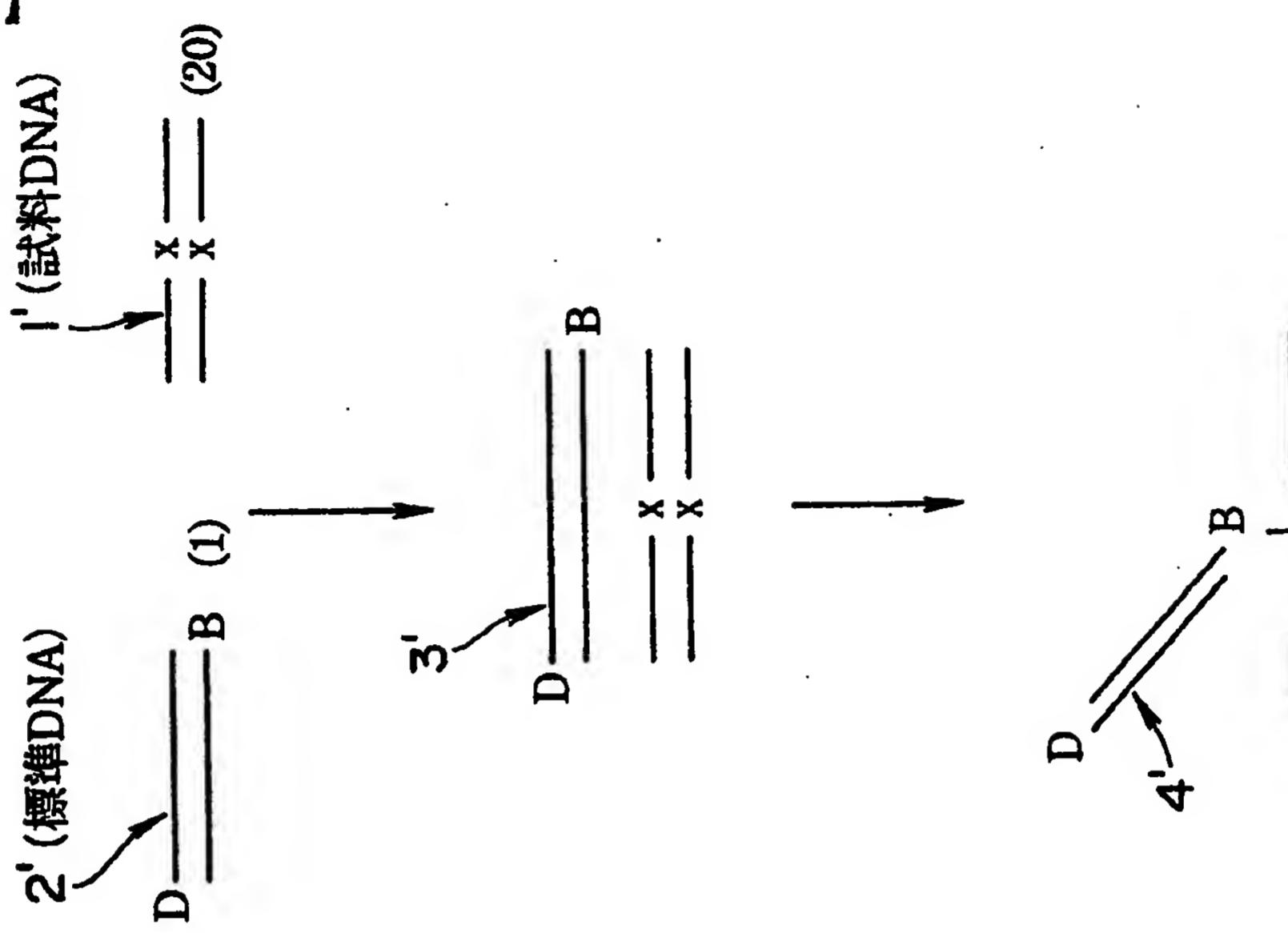
【図2】



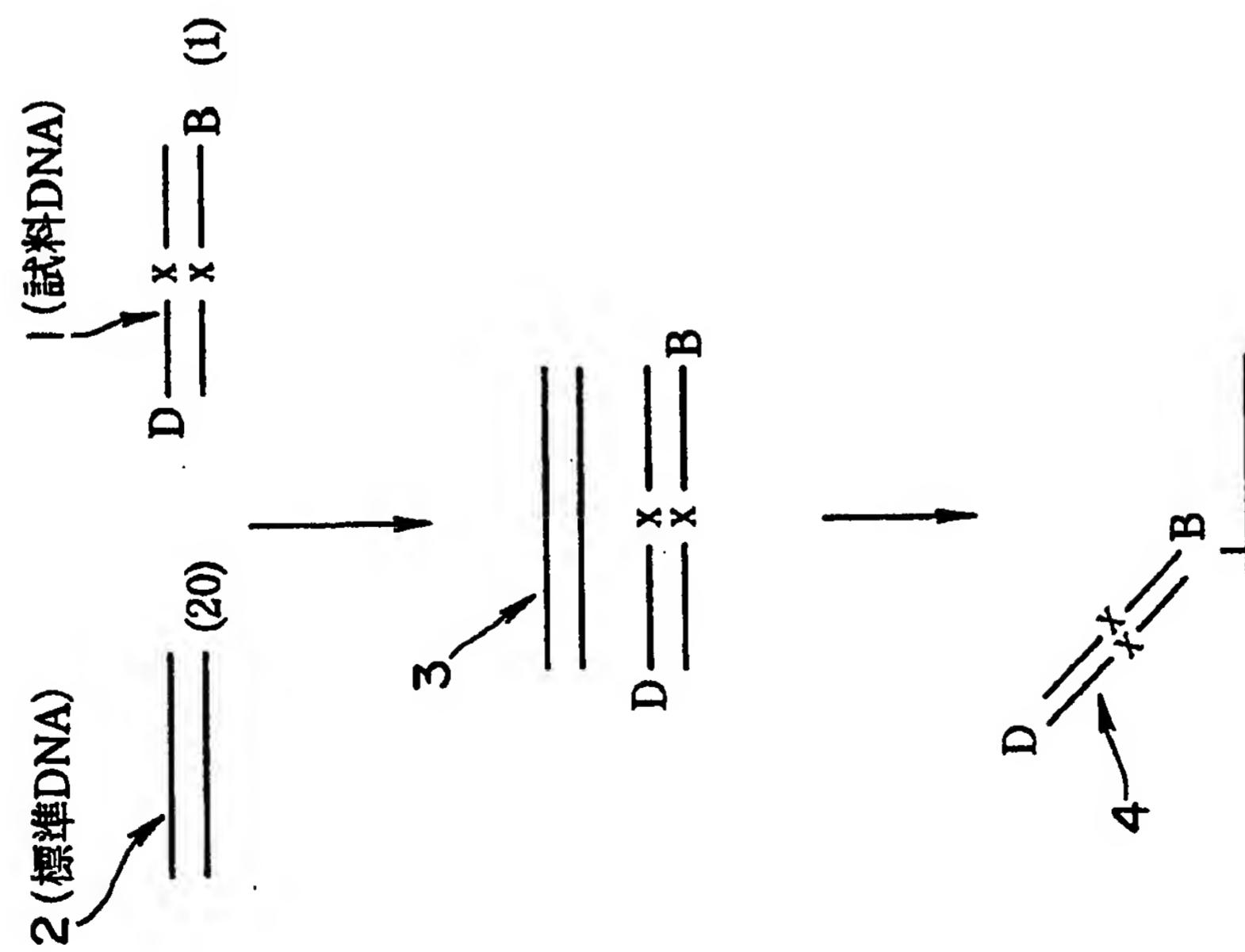
3/4

【図3】

(B)

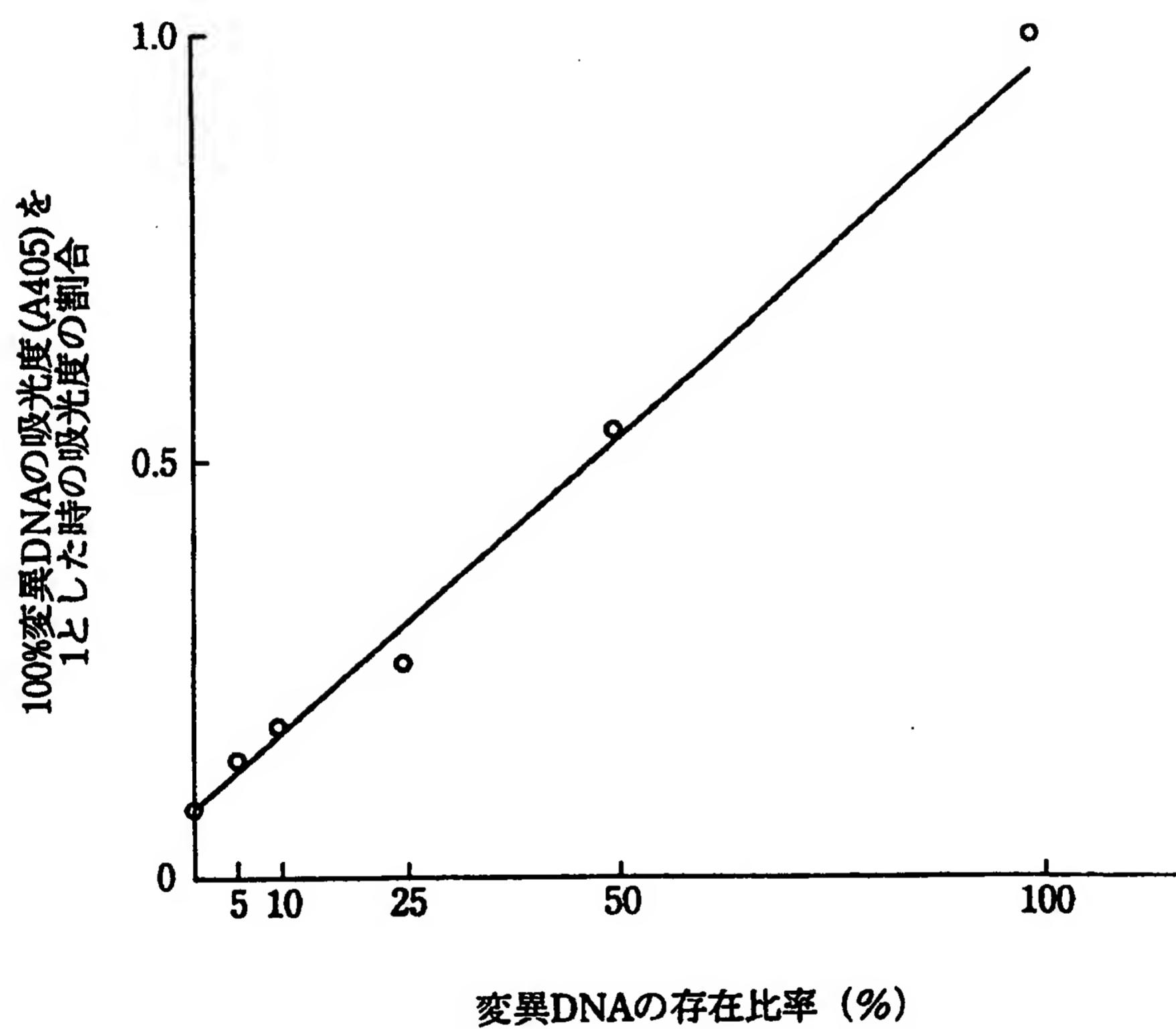


(A)



4/4

【図4】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Analytical Biochemistry, Vol. 205, (1992) J. C. Nicolas et al. "Quantitative and Qualitative Analysis of Amplified DNA Sequences by a Competitive Hybridization Assay" P. 193-199	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 31, 1994 (31. 08. 94)

Date of mailing of the international search report

September 20, 1994 (20. 09. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁶ C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁶ C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Analytical Biochemistry , 第205巻, (1992) J. C. Nicolas et al. 「Quantitative and Qualitative Analysis of Amplified DNA Sequences by a Competitive Hybridization Assay」 p. 193-199	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の
 後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
 に引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
 性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
 がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 31.08.94	国際調査報告の発送日 20.09.94
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 平田和男  電話番号 03-3581-1101 内線 3448